様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　23 年　6 月　21 日現在

機関番号：８２１１２
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007　～　2010
課題番号：１９３８００６８
研究課題名（和文）昆虫由来の活性物質を利用した新規抗トリパノソーマ薬剤開発のための基盤的研究
研究課題名（英文）Basic research on anti-trypanosomal drug discovery using bioactive substances derived from insect
研究代表者
石橋　純（ISHIBASHI　JUN）
独立行政法人農業生物資源研究所　生体防御研究ユニット　ユニット長
研究者番号：２０３９１５７６

研究成果の概要（和文）：トリパノソーマ原虫(*Trypanosoma brucei brucei*)に対するカブトムシディフェンシン由来改変ペプチドの作用点は細胞膜であることを明らかにした。改変ペプチドを固定化した機能性素材を開発した。
カイコ蛹抽出物由来抗トリパノソーマ活性物質の構造を決定したところ、ビタミン B_2 として知られるリボフラビンと同定された。トリパノソーマ原虫感染マウスへのリボフラビンの経口投与により、血中の原虫の増加および死を有意に遅らせた。一方、腹腔内、静脈注射では治療効果はなかった。

研究成果の概要（英文）： The mode of action of beetle-defensin derived peptides against *Trypanosoma brucei brucei* was revealed that the peptides attack cellular membrane of the parasites. We developed multi-functional materials on which the defensin derived peptides were covalently bound on the surface.
We purified an anti-trypanosomal substance from *Bombyx* pupae. Surprisingly, the active substance was identified as riboflavin, known as vitamin B_2. Oral administration of riboflavin significantly delayed death of trypanosome-infected mice and proliferation of parasites. However, intravenous or intraperitoneal injection of riboflavin did not affect mortality and proliferation of parasites.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	5, 300, 000	1, 590, 000	6, 890, 000
2008 年度	3, 300, 000	990, 000	4, 290, 000
2009 年度	3, 300, 000	990, 000	4, 290, 000
2010 年度	3, 300, 000	990, 000	4, 290, 000
年度			
総　計	15, 200, 000	4, 560, 000	19, 760, 000

研究分野：農芸化学
科研費の分科・細目：生物有機化学
キーワード：トリパノソーマ、ディフェンシン、細胞膜、リン脂質、固定化、カイコ、リボフラビン、経口投与

１．研究開始当初の背景

アフリカトリパノソーマ症はTrypanosoma科の原虫により引き起こされる人獣共通感染症であり、双翅目昆虫であるツェツェバエ（*Glossina palpalis*）により媒介される。アフリカトリパノソーマ症はアフリカサハラ砂漠以南地域の36カ国において、ヒトに対する眠り病は毎年約７万

人の死者、ウシに対するナガナ病は６千万頭を危機にさらし、年間約50億ドルの被害をもたらしているとされる。トリパノソーマ症は、このように深刻な問題であることから、ツェツェバエの防除、抵抗性の牛品種の育成、予防薬の開発などの対策がとられているが、有効な手だてがないのが現状である。その原因はツェツェバエの殺虫剤抵抗性の獲得、トリパノソーマが細胞表面の抗原を変異させることにより、宿主の免疫系を回避しているためワクチン開発が困難であること、様々な抗トリパノソーマ薬剤の開発がなされているが、現在のところヒ素剤等の副作用が強い薬剤しか存在せず、更にこれらの薬剤に対する耐性株も出現していること等である。この状況を打開するために、画期的な抗トリパノソーマ薬剤の開発が待たれている。

我々はこれまでに、昆虫の生体防御機構を解明し、それらを人類の健康の増進に利用することを目的に、昆虫由来のさまざまな抗菌タンパク質を単離し、その作用機構を明らかにするとともに、応用に向けた研究を進めてきた。その中でも、鞘翅目昆虫であるカブトムシ（*Allomyrina dichotoma*）及び熱帯地方に生息し、ヤシの害虫として知られているタイワンカブトムシ（*Oryctes rhinoceros*）由来の抗菌タンパク質ディフェンシンの構造をタンパク質工学的に改変することによって、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）等の薬剤耐性細菌を含む広範な細菌に対して強い抗菌活性を示し、*in vivo* でも MRSA 感染マウスの治療効果を持つ 9 残基の改変ペプチドを 4 種類開発した。我々はこれらの改変ペプチドが、哺乳類の体内における形態である血流型のトリパノソーマに対しても活性を示すことを見いだした。酸性リン脂質に富み、負電荷を帯びた細菌の細胞膜に選択的に結合し、膜バリア能を破壊する作用機構により殺菌する改変ペプチドが、真核生物であり電気的に中性な細胞膜を持つと考えられるトリパノソーマに対して活性を示すことは、新たな作用機構を持つことが示唆され、この改変抗菌ペプチドによるトリパノソーマに対する作用機構を明らかにすることにより、これをモデルとして画期的な新規薬剤の開発が進むことが期待される。

また、本改変ペプチドの元となったディフェンシンを持つタイワンカブトムシの体液中の抗トリパノソーマ活性を調べたところ、強い活性が認められた。この活性は熱処理、プロテアーゼ処理をしても失われなかったことから、ディフェンシンとは異なる非タンパク性の抗トリパノソーマ活性物質が存在することが明らかになった。昆虫は全生物種の 8 割を占めるほど多様化し、様々な環境に適応しており、未知の有用物質の宝庫であると考えられている。本研究においてはタイワンカブトムシ等の昆虫から新たな活性物質の探索を行い、画期的な新規抗トリパノソーマ薬剤開発のためのシーズとなることが期待される。

２．研究の目的

本研究の目的は、画期的なトリパノソーマ感染症に対する新規薬剤開発のための基盤を築くことである。具体的には、抗トリパノソーマ活性を示す昆虫由来抗菌タンパク質を改変して得られたペプチドの作用機構の解明、及び昆虫由来の新規抗トリパノソーマ活性物質を探索することにより、トリパノソーマ症治療薬の開発のためのシーズとすることである。

(1) これまでに我々が開発した昆虫ディフェンシン由来の改変ペプチドは、強い抗トリパノソーマ活性を示す。これらのペプチドは正電荷を帯び、細菌に対しては細胞壁の負電荷と電気的に引き合うことで結合し、膜バリア能を破壊する。しかしながら、真核生物であるトリパノソーマに対しては、如何なる作用機構で効果を示すのか明らかでない。本研究期間内においては、この作用機構を明らかにすることにより、新たな抗トリパノソーマ薬剤の開発のための基礎的知見とする。

(2) タイワンカブトムシ、カイコ等の他の昆虫からスクリーニングを行い、新たな抗トリパノソーマ活性物質を探索し、

それらについて構造決定を行う。更にこれら抗トリパノソーマ活性物質の *in vivo* でのトリパノソーマ感染マウスに対する治療実験を行い、トリパノソーマ症治療薬への応用の基礎的知見を得る。

３．研究の方法

研究材料としては、ツェツェバエにより媒介され、ウシにナガナ病を引き起こすが、ヒトには感染しない亜種のトリパノソーマ原虫、*Trypanosoma brucei brucei* を用いる。生物活性の検定は、トリパノソーマの増殖阻止活性を指標とする。

(1) 改変ペプチドは細菌に対して、酸性リン脂質を豊富に含有し負電荷を帯びている細胞膜を作用点とし、膜バリア能を破壊して溶菌を引き起こす。トリパノソーマ原虫に対しても改変ペプチドが溶菌を引き起こすかどうかを、ペプチドを作用させたトリパノソーマ原虫の形態を、顕微鏡および電子顕微鏡で詳細に観察し、細胞の溶解や形態異常等を引き起こしているかを明らかにする。

改変ペプチドは細菌に対しては細胞膜を作用点としていることから、トリパノソーマ原虫に対しても細胞膜へ直接作用し、殺している可能性が示唆される。この可能性を検証するために、膜電位感受性の蛍光色素である 3,3'-diethyloxacarbocyanine iodide ($DiOC_2$) で血流型のトリパノソーマ原虫を標識し、改変ペプチドによるトリパノソーマ原虫細胞膜の脱分極について検証する。ポジティブコントロールとしてはプロトノフォアである CCCP を用い、細胞膜の電荷が合成ペプチド処理により消失するかどうかを物理化学的に検証する。

トリパノソーマは真核生物であるが、細胞膜が改変ペプチドの標的である場合、特殊なリン脂質組成を持つことが示唆される。トリパノソーマの細胞膜リン脂質組成を解析することにより、その作用機構を明らかにする。

改変ペプチドを素材上に固定化することにより、抗菌、抗ガン、抗原虫等の機能を持つ新規素材を開発する。

(2) タイワンカブトムシ幼虫、カイコ等昆虫の体液および抽出物の抗トリパノソーマ活性物質を探索する。抗トリパノソーマ活性が認められたものから、各種クロマトグラフィー、HPLC を使用し、トリパノソーマの増殖抑制活性を指標に、抗トリパノソーマ活性物質の単離を行う。単離した活性物質の構造を NMR、質量分析などで決定する。構造決定された活性物質について、マウスを用いた治療実験を行う。

４．研究成果

(1) トリパノソーマ原虫に対するカブトムシディフェンシン由来改変ペプチドの作用点を明らかにするため、膜電位感受性の蛍光色素で血流型のトリパノソーマ原虫を標識し、フローサイトメトリーで解析を行ったところ、改変ペプチドが細胞膜の脱分極を引き起こしていることが明らかになった。また、電子顕微鏡観察を行ったところ、改変ペプチドにより細胞膜が破壊されていることが明らかになった。トリパノソーマの細胞膜の膜組成を測定したところ、酸性リン脂質のフォスファチジルセリンを含むことが明らかになった。このことから真核生物であるトリパノソーマも負電荷を帯びた細胞膜を持ち、改変ペプチドにより攻撃を受けることが示唆された。

改変ペプチドを固定化した機能性素材を開発した。

(2)昆虫由来の抗トリパノソーマ活性物質を探索したところ、カイコ蛹抽出物、タイワンカブトムシ体液、タカサゴシロアリ抽出物等に強い抗トリパノソーマ活性を見出した。この内、カイコ蛹を抽出し、Sep-pakC_{18} カートリッジおよび二段階の逆相 HPLC により活性物質の単離を行った。H^1-および C^{13}-NMR および質量分析により構造決定を行ったところ、活性物質はビタミン B_2 として知られるリボフラビンであると同定された。リボフラビンは光分解により、細胞毒性を示すルミクロームを生じる。In vitro では、通常

の室内の光条件では強い活性がみられたものの、全暗条件では弱い活性しか示さなかったことから、活性の本体はリボフラビンの光分解物であると考えられた。トリパノソーマ原虫を腹腔内注射により感染させたマウスにリボフラビンを経口投与したところ、特別な光照射のない条件において、血中の原虫の増加およびマウスの死を有意に遅らせた。一方、腹腔内注射、静脈注射では治療効果はみられなかった。また、リボフラビンおよびルミクロームは経口投与で同等の延命効果を示した。リボフラビンは摂取に対する安全性は確認されており、安全で経口投与可能な薬剤が存在しないトリパノソーマ症に対する薬剤として、新たな可能性を示すものである。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計２件）

① Yamage M, Yoshiyama M, Grab DJ, Kubo M, Iwasaki T, Kitani H, Ishibashi J & Yamakawa M (2009) Characteristics of novel insect defensin-based membrane-disrupting trypanocidal peptides. *Biosci. Biotech. Biochem.* 73, 1520-1526 査読有り

② Nakamura M, Iwasaki T, Tokino S, Asaoka A, Yamakawa M & Ishibashi J (2011) Development of a bioactive fiber with immobilized synthetic peptides designed from the active site of a beetle defensin. *Biomacromolecules* 12(5) 1540-1545 査読有り

〔学会発表〕（計５件）

① 芳山三喜雄・小野裕嗣・山川　稔・石橋　純、昆虫由来抗トリパノソーマ活性物質の探索、日本蚕糸学会 79 回大会、H21.3.21、東京農工大学

② Yoshiyama M, Ono H, Yamakawa M & Ishibashi J An anti-trypanosomal substance from an insect; riboflavin is effective via oral administration, Keystone Symposia Drug Discovery for Protozoan Parasites, H21.3.23, コロラド州ブレッケンリッジ

③ 芳山三喜雄・小野裕嗣・山川　稔・石橋　純、昆虫由来抗トリパノソーマ活性物質の探索、日本農芸化学会 2009 年度大会、H21.3.28、マリンメッセ福岡

④ 中村　允・岩崎　崇・解野誠司・朝岡愛・山川　稔・石橋　純、昆虫ディフェンシン改変ペプチドを利用した抗菌性素材の開発、平成 22 年度日本蚕糸学会第65回東北支部 第66回中部支部 第62回東海支部 第76回関西支部 第66回九州支部 合同大会、H22.11.14、浦添市てだこホール

⑤ 中村　允・岩崎　崇・解野誠司・朝岡愛・山川　稔・石橋　純、昆虫ディフェンシン改変ペプチド固定化抗菌性素材の開発、日本農芸化学会 2011 年度大会、H23.3.27、京都女子大学

〔図書〕（計１件）

分子昆虫学－ポストゲノムの昆虫研究－神村　学・葛西真治・畠山正統・日本典秀・竹内秀明・石橋　純編

〔産業財産権〕

○出願状況（計１件）

名称：抗トリパノソーマ薬

発明者：石橋　純・芳山三喜雄・小野裕嗣・山川　稔

権利者：農業生物資源研究所、食品総合研究所

種類：特許

番号：　特願 2008−298492
　　　　特開 2010−120911

出願年月日：H20.11.21

国内外の別：国内

６．研究組織

(1)研究代表者

石橋　純（Ishibashi Jun）
独立行政法人　農業生物資源研究所
生体防御研究ユニット　ユニット長
研究者番号：20391576

(2)研究分担者

（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者

（　　）

研究者番号：